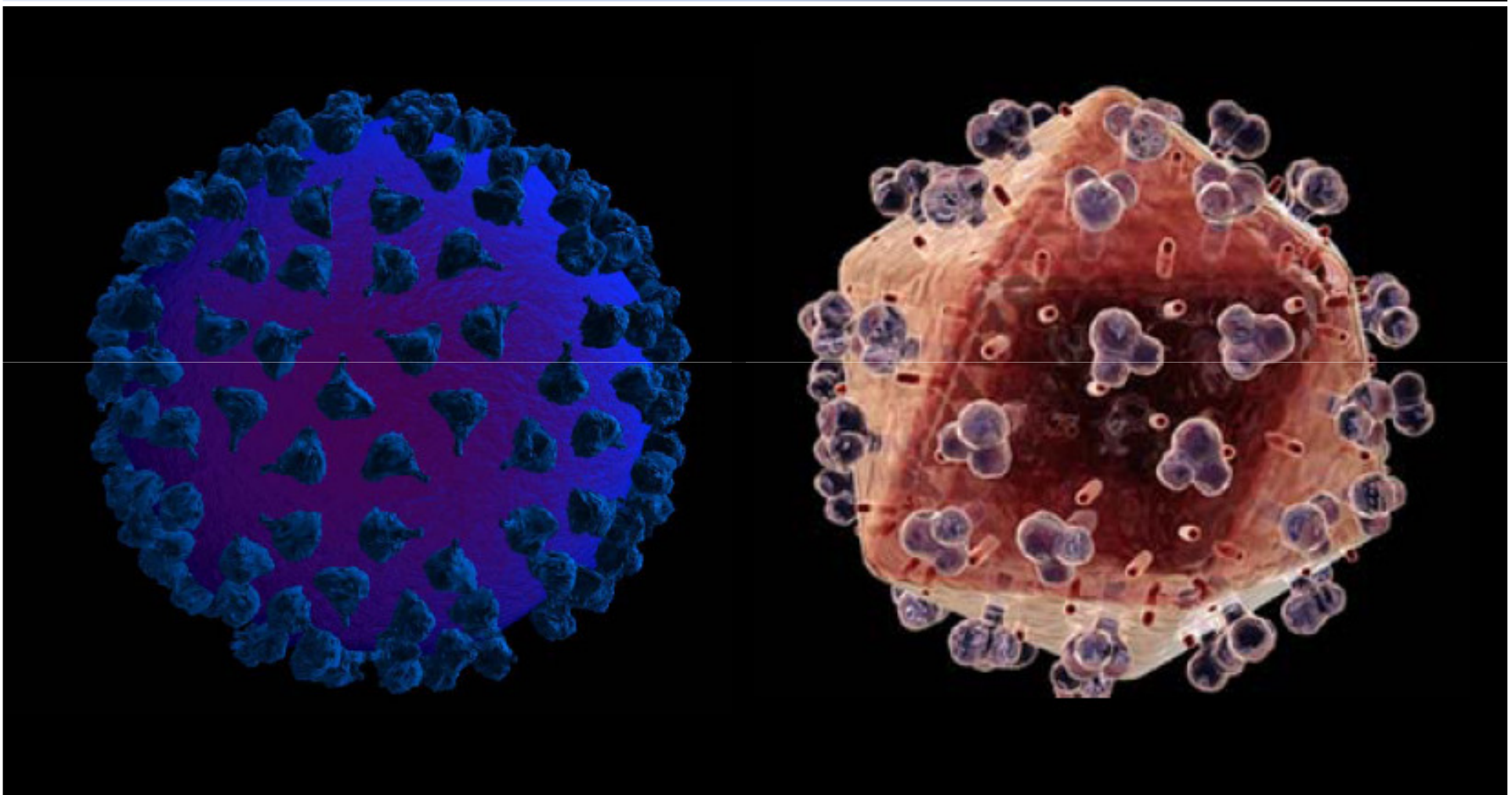


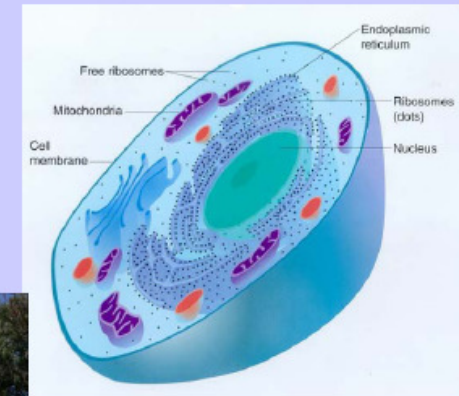
# Grundpraktikum Genetik - Bakteriophagen als genetisches Modellsystem



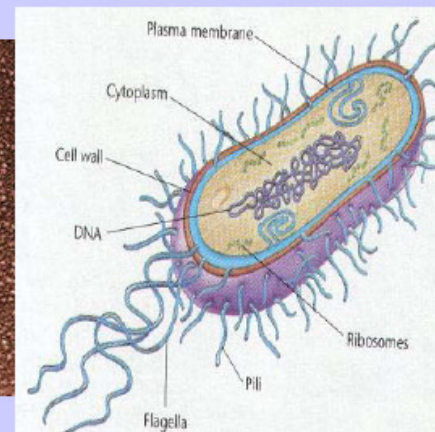
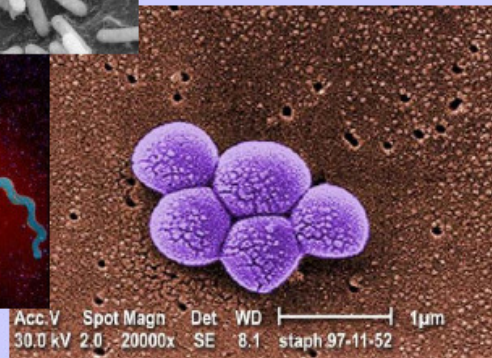
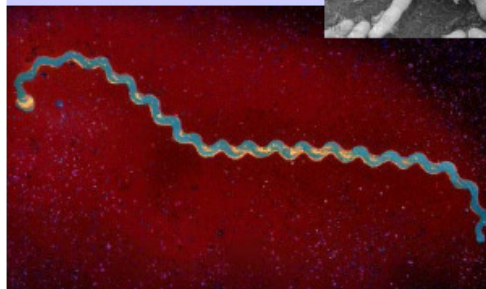
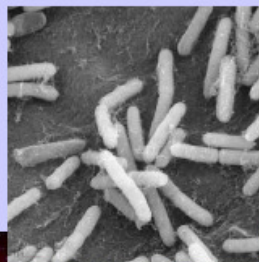
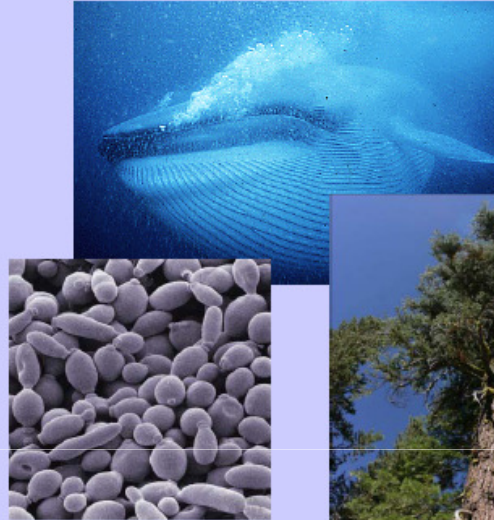
<http://quintlab.openwetware.org>

→ teaching

# Zelluläres Leben



Eukaryotes



Bacteria  
Archaea

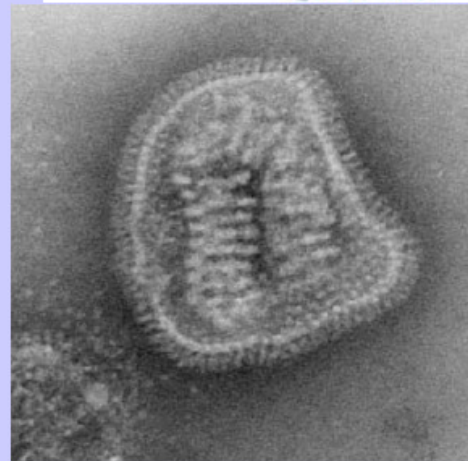
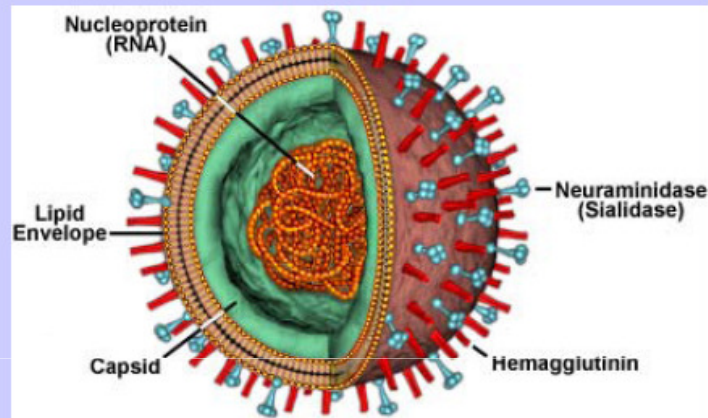


# Viren sind nicht zellulär!

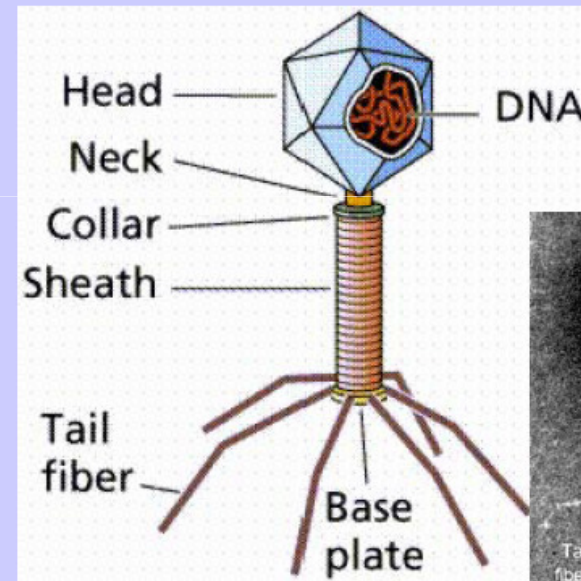
Gelten nicht als Lebewesen

→ enthalten lediglich Erbinformationen zur eigenen Vermehrung

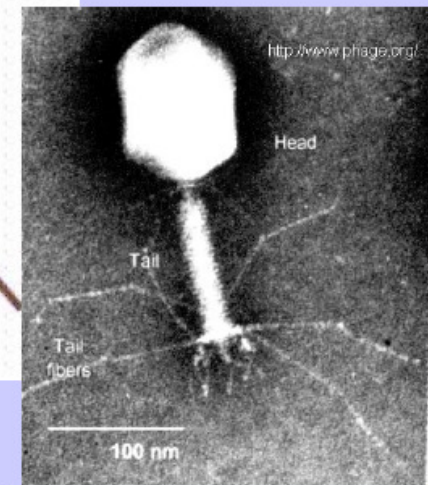
→ kein eigener Stoffwechsel



Influenza  
virus

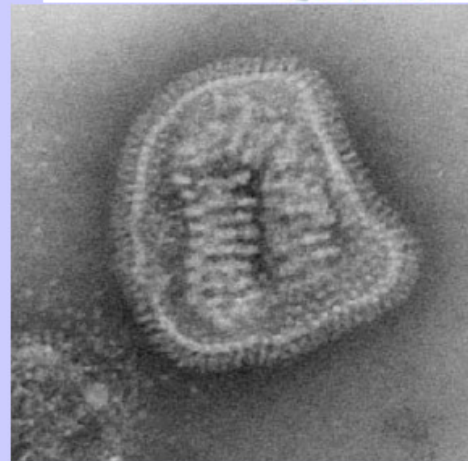
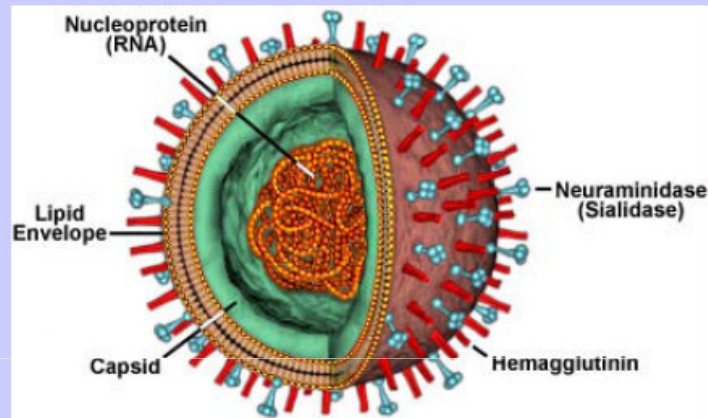


Bacteriophage T4  
("eater of bacteria")

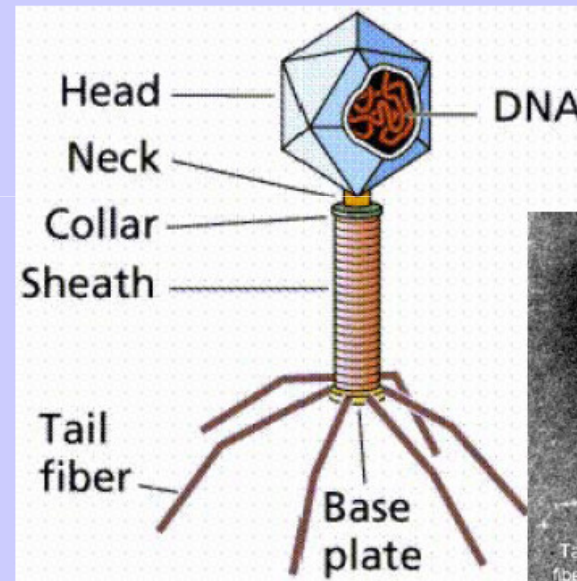


## Charakteristika

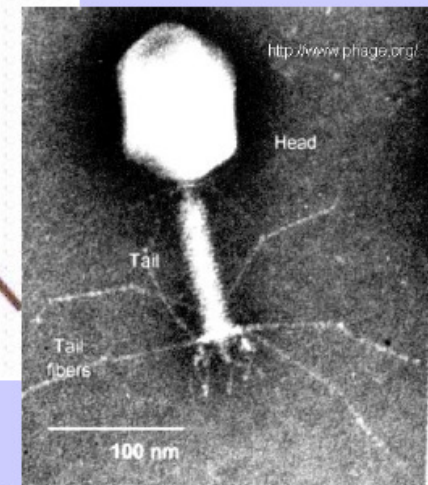
1. Obligate intrazelluläre Parasiten
2. Klein: filtrierbar durch bakteriologische Filter
3. Ein Typ von Nukleinsäure (DNA oder RNA)
4. Tragen eine Proteinhülle (Capsid)
5. Vermehren sich innerhalb lebender Zellen unter Nutzung der biosynth. Maschinerie des Wirtes



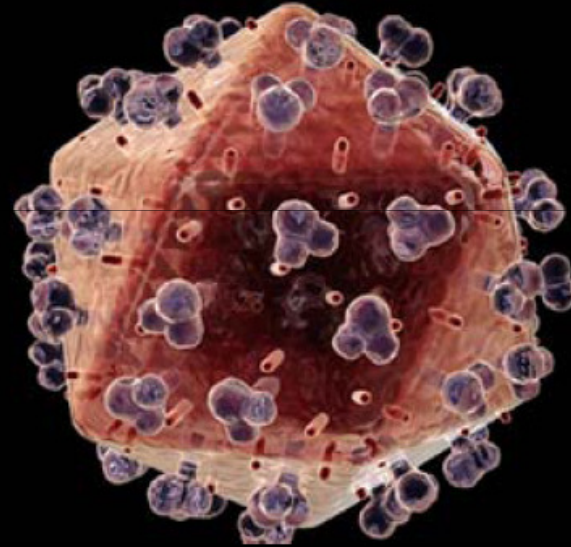
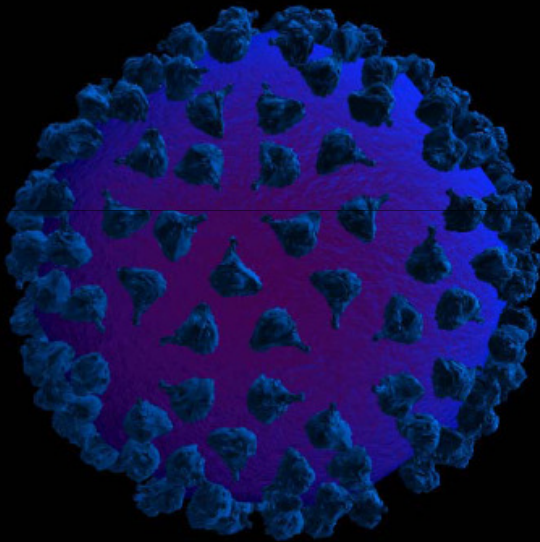
Influenza  
virus



Bacteriophage T4  
("eater of bacteria")



**Sind Viren eine erfolgreiche ,Lebensform‘?**

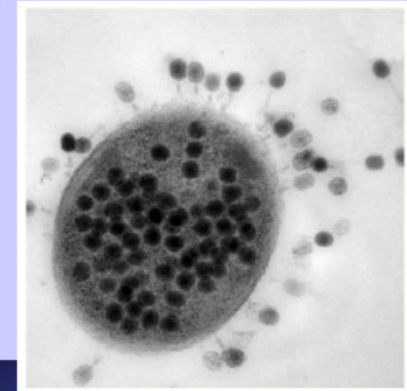
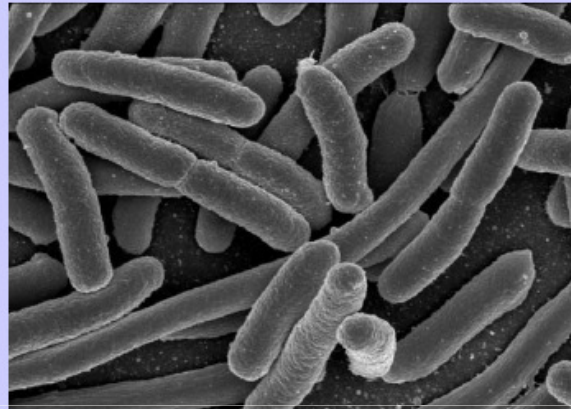
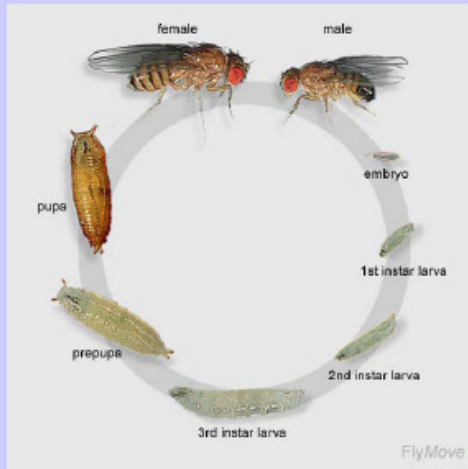


# Kriterien zur Beurteilung einer erfolgreichen Lebensform

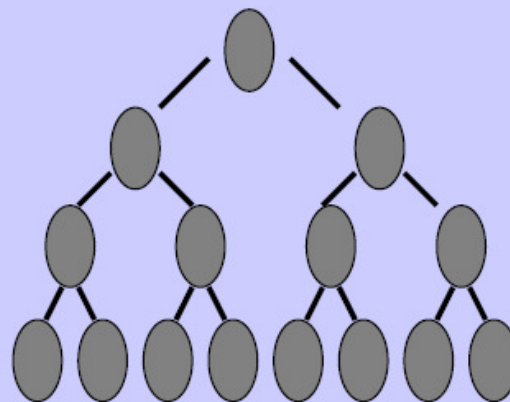
- Vermehrungspotential
  - Reproduktive Strategien, Reproduktionsraten, Genetik
- Vorkommen
- Biodiversität
- Persistenz
  - Adaptierbarkeit, Vermeidung von Aussterben



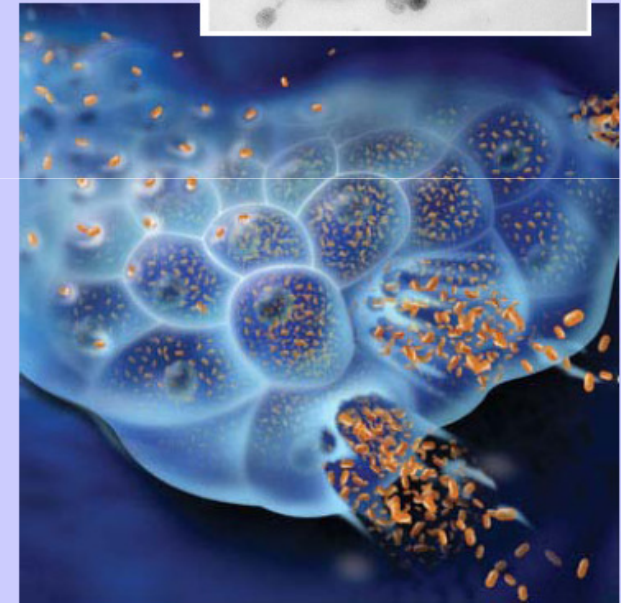
# Vermehrung



Some eukaryotes  
reproduce quickly



Bacteria and Archaea  
grow faster



Viruses are fastest

dsDNA

dsDNA ssDNA  
dsRNA ssRNA

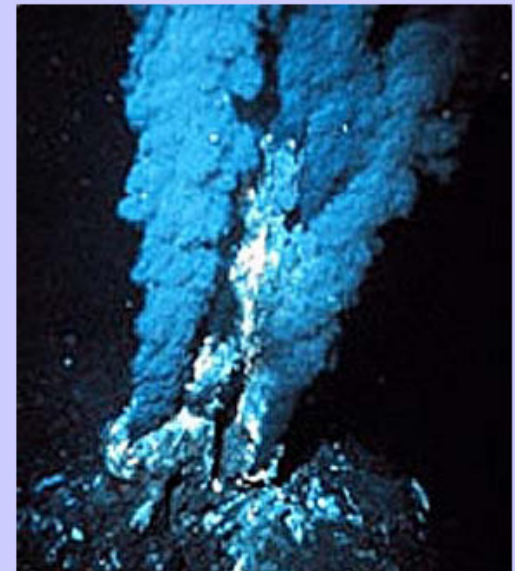
Turner 2011

# Kriterien zur Beurteilung einer erfolgreichen Lebensform

- Vermehrungspotential
  - Reproduktive Strategien, Reproduktionsraten, Genetik
- **Vorkommen**
- Biodiversität
- Persistenz
  - Adaptierbarkeit, Vermeidung von Aussterben



# Vorkommen - Habitate



# Vorkommen - Zahlen

ca. 50 Mio =  $5 \times 10^7$  Viren pro ml Meerwasser → noch mehr in Erde

→ Phagen lysieren bis zu 40% aller Bakterien in den Weltmeeren → **CO<sub>2</sub> Bilanz**

→  **$10^{31}$**  Viren auf der Erde → 10.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000!!!

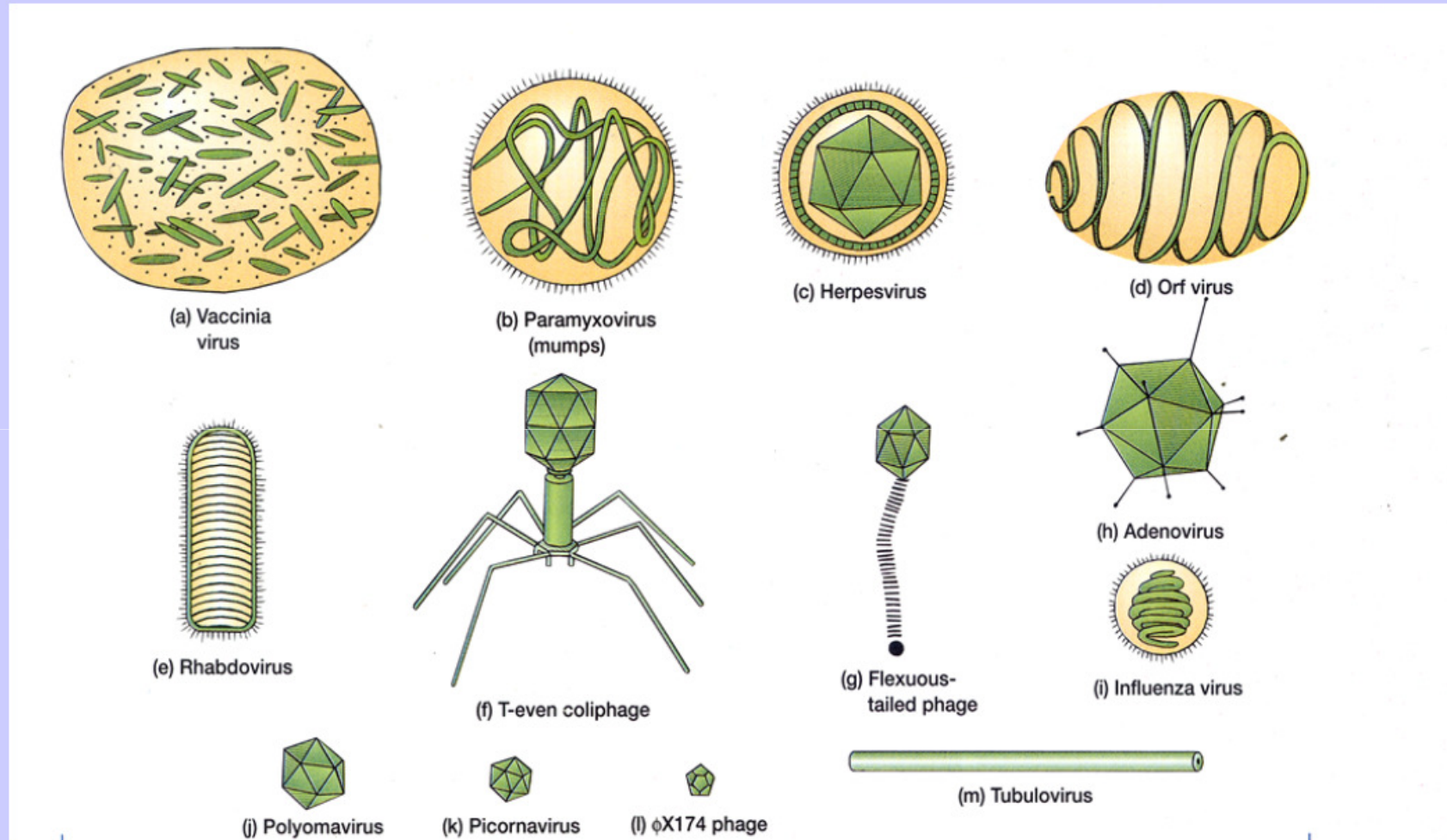
→ 250 Mio Lichtjahre Virusgenome *end to end*



# Kriterien zur Beurteilung einer erfolgreichen Lebensform

- Vermehrungspotential
  - Reproduktive Strategien, Reproduktionsraten, Genetik
- Vorkommen
- **Biodiversität**
- Persistenz
  - Adaptierbarkeit, Vermeidung von Aussterben

# Biodiversität



1 micrometer =  $1/1000^{\text{th}}$  of a millimeter



# Phagen Morphologie

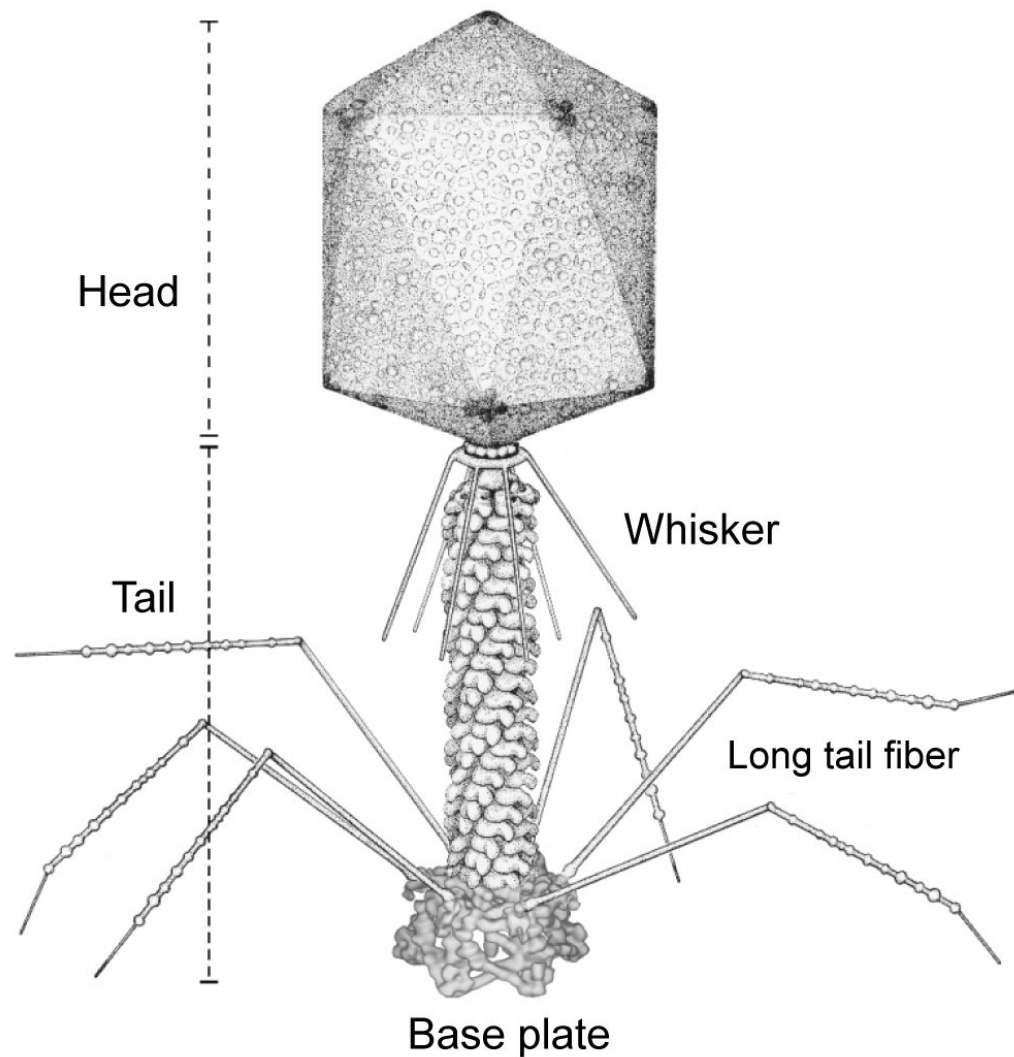
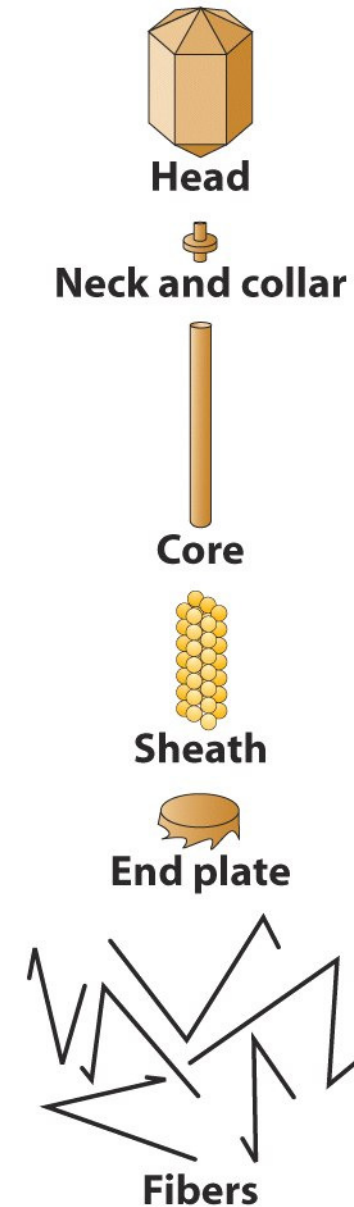


Fig.1-1

Structure of T4 phage  
(Eiserling, 1983)

## T4 phage components



# Kriterien zur Beurteilung einer erfolgreichen Lebensform

- Vermehrungspotential
  - Reproduktive Strategien, Reproduktionsraten, Genetik
- Vorkommen
- Biodiversität
- Persistenz
  - **Adaptierbarkeit**, Vermeidung von Aussterben

# Adaptierbarkeit

1. Viren existieren in größerer Zahl als alle anderen Lebensformen
  2. Viren haben kürzere Generationszyklen als die meisten anderen Lebensformen
  3. Nahezu alle anderen Lebensformen sind Wirtsorganismen von Viren
  4. Vireng Genome sind oft Mosaik vieler Genome
- Viren evolvieren schneller als alle anderen Lebensformen
- Bessere Anpassbarkeit/Adaptation

**Fazit:**

**Viren sind DIE erfolgreichste ‚Lebensform‘ auf diesem Planeten!**

# Entdeckung Viren

---



The generally recognised beginning of Virology is a paper presented to the St. Petersburg Academy of Science on the 12th February **1892** by **Dimitri Iwanowski** (1864-1920), a Russian botanist. He showed that extracts from diseased tobacco plants could transmit disease to other plants after passage through ceramic filters fine enough to retain the smallest known bacteria.



# Entdeckung Bakteriophagen

---



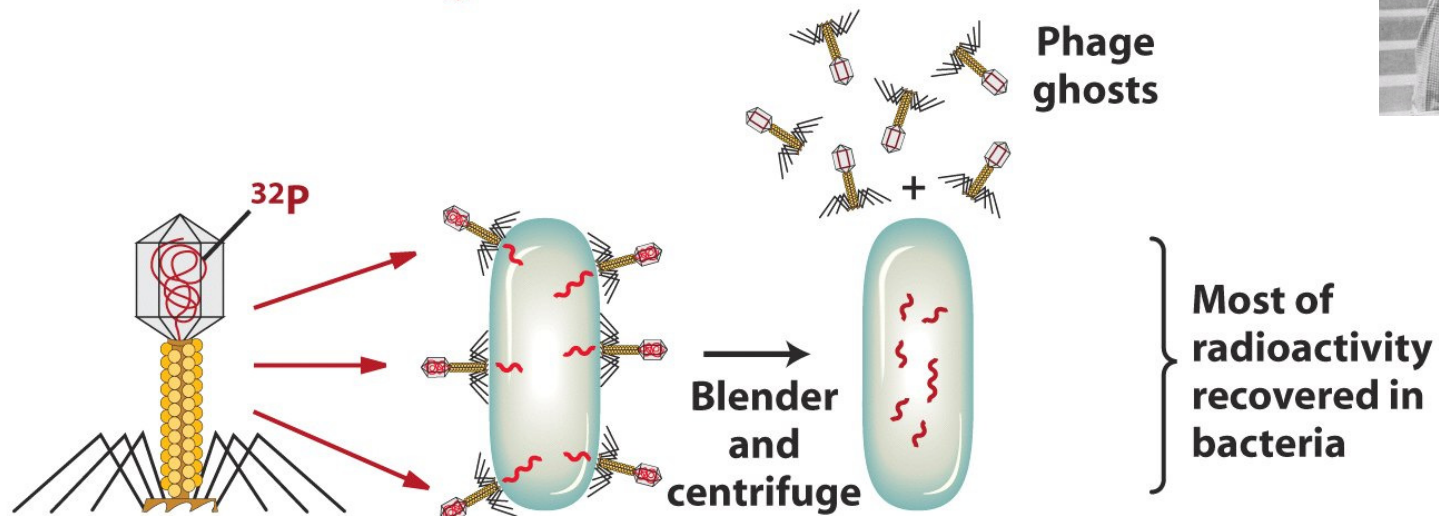
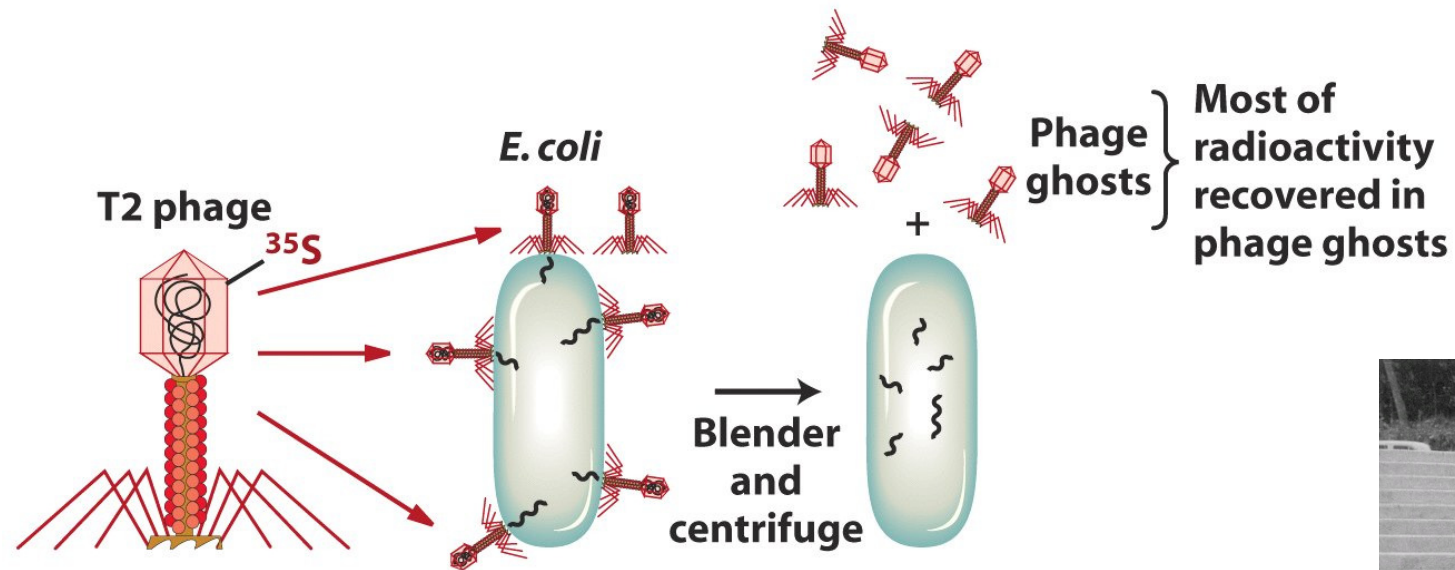
“Bakterielle Viren” wurden zuerst von Frederick Twort (in 1915; links) und Felix d’Hérelle (in 1917; rechts) beschrieben. d’Hérelle bezeichnete sie wegen ihrer Eigenschaft Bakterien auf der Oberfläche von Agarplatten zu lysieren als “Bacteriophagum intestinale”. Diese Viren wurden rasch von vielen Wissenschaftlern als Modellorganismen für verschiedene Aspekte der Virologie (Struktur, Genetik, Replikation) genutzt.

# Schlüsselexperimente

---

- 1943** Salvador E. Luria & Max Delbrück (**Fluktuationstest**). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511
- 1952** Alfred D. Hershey & Martha Chase (**DNA als Träger der Erbinformation**). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56
- 1968** S. Linn & W. Arber (**Restriktionsenzyme**). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1300-1306.
- 1973** S.N. Cohen, A.C. Chang, H.W. Boyer & R.B. Helling (**Molekulare Klonierung**). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244.
- 1977** A.M. Maxam & W. Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- 1977** F. Sanger, S. Nicklen & A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- 1977** F. Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe & M. Smith. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695.
- 1983** D.L. Daniels, J.L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, G.B. Petersen & F.R. Blattner. Appendix II: Complete annotated lambda sequence. In: R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl and R.A. Weisberg (Eds.); *LAMBDA II*: 519-674; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 1990** K. Valegard, L. Liljas, K. Fridborg & T. Unge. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345: 36-41.
- 1992** R. McKenna, D. Xia, P. Willingmann, L.L. Ilag & M.G. Rossmann. Structure determination of the bacteriophage phiX174. *Acta Crystallogr B* 48: 499-511.

# Hershey & Chase (1952)



# Schlüsselexperimente

- 1943** Salvador E. Luria & Max Delbrück (**Fluktuationstest**). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511
- 1952** Alfred D. Hershey & Martha Chase (**DNA als Träger der Erbinformation**). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56
- 1968** S. Linn & W. Arber (**Restriktionsenzyme**). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1300-1306.
- 1973** S.N. Cohen, A.C. Chang, H.W. Boyer & R.B. Helling (**Molekulare Klonierung**). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244.
- 1977** A.M. Maxam & W. Gilbert. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- 1977** F. Sanger, S. Nicklen & A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- 1977** F. Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe & M. Smith. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695.
- 1983** D.L. Daniels, J.L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger, A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill, G.B. Petersen & F.R. Blattner. Appendix II: Complete annotated lambda sequence. In: R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl and R.A. Weisberg (Eds.); *LAMBDA II*: 519-674; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- 1990** K. Valegard, L. Liljas, K. Fridborg & T. Unge. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345: 36-41.
- 1992** R. McKenna, D. Xia, P. Willingmann, L.L. Ilag & M.G. Rossmann. Structure determination of the bacteriophage phiX174. *Acta Crystallogr B* 48: 499-511.



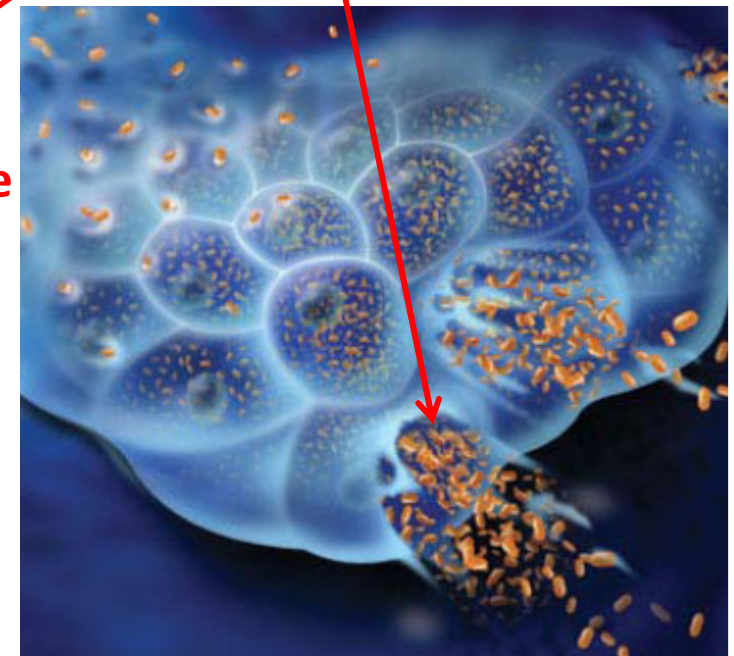
# Phagen/Viren allgemein

## T-Phagen

Name	Plaque-größe	Kopf (nm)	Schwanz (nm)	Latenz-zeit (min)	„Burst“-Größe
T1	mittel	50	150 x 15	13	180
T2	klein	65 x 80	120 x 20	21	120
T3	groß	45	unsichtbar	13	300
T4	klein	65 x 80	120 x 20	23,5	300
T5	klein	100	winzig	40	300
T6	klein	65 x 80	120 x 20	25,5	200-300
T7	groß	45	unsichtbar	13	300



Infektion der Zelle bis Lyse



# Lebenszyklus

1. Anheftung
2. Penetration
3. Reprogrammierung
4. Synthese von Phagenpartikeln
5. Assembly
6. Lyse

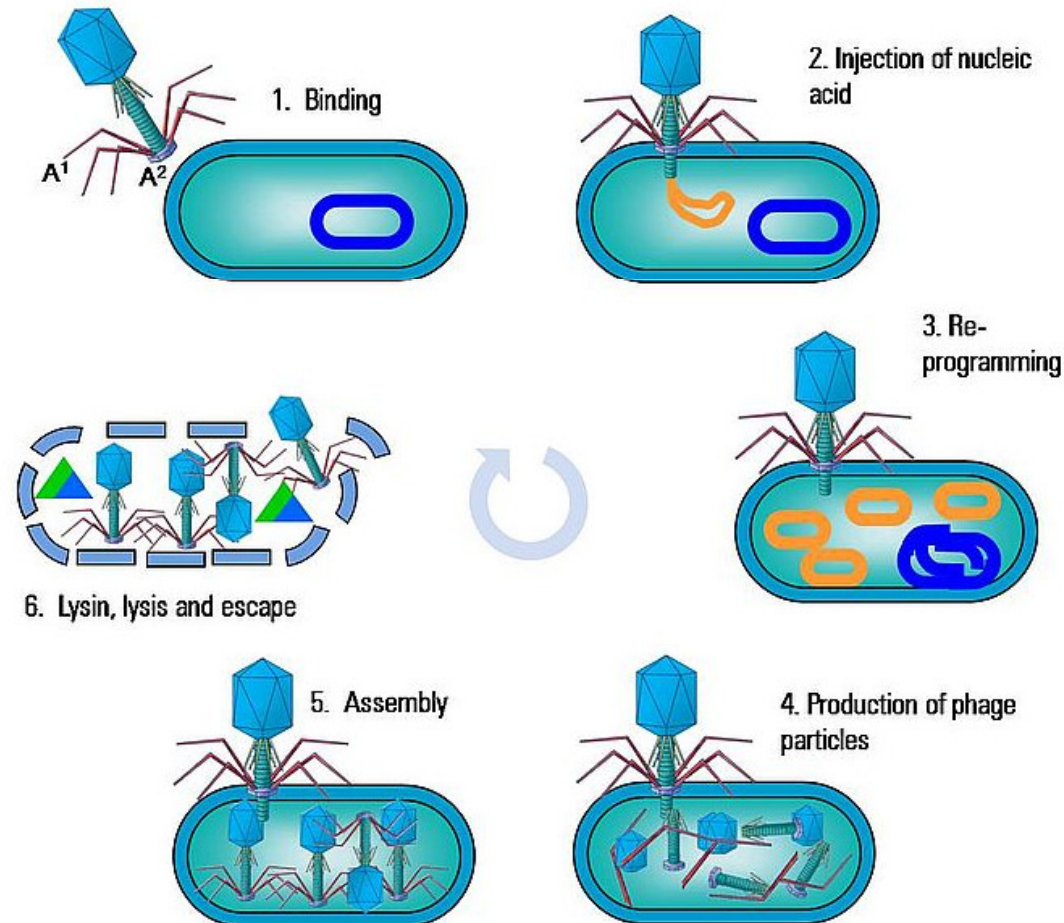


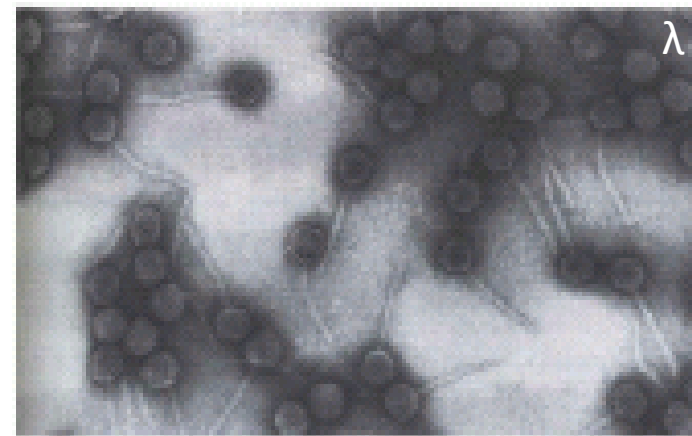
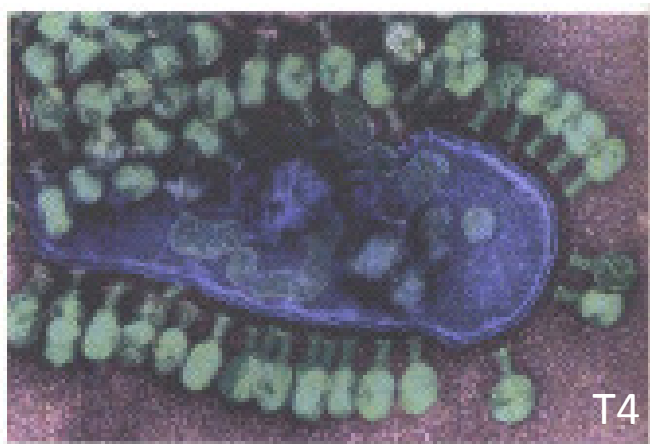
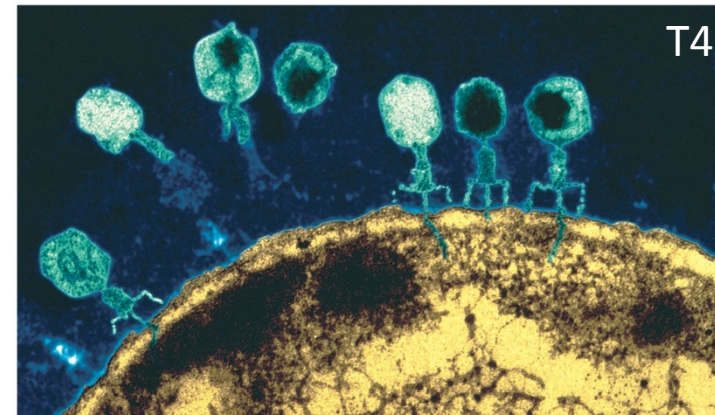
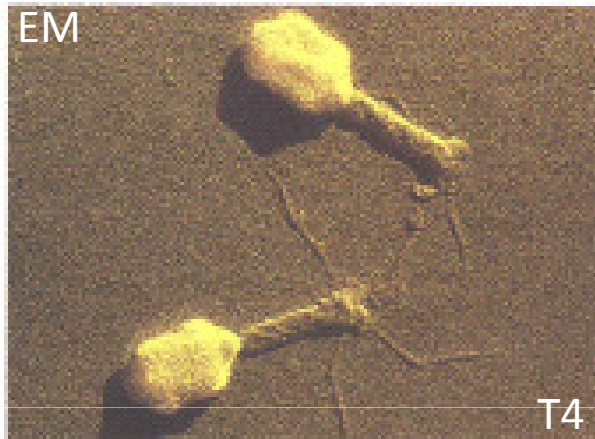
Bild: Schematischer Lebenszyklus von Bakteriophagen und der Hyglos Technologie zusammengefasst in 3 Komponenten (Copyright: Hyglos GmbH)

# Phagen – Genomgröße und Nukleinsäuren

Phage	Größe (Nt.)	Nukleinsäure	einzelsträngig	doppelsträngig	linear	zirkulär
MS2	3 569	RNA	+		+	
Q-beta	4 220	RNA	+		+	
φ6		RNA		+		
φx174	5 386	DNA	+			+
M13 (f1)	6 407	DNA	+			+
λ	48 502	DNA		+	+	
Mu	36 717	DNA		+	+	
P1	94 800	DNA		+	+	
P2	33 593	DNA		+	+	
P4	11 624	DNA		+	+	
T1	48 836	DNA		+	+	
T4	168 903	DNA		+	+	
T5	121 750	DNA		+	+	
T7	39 937	DNA		+	+	
G	~670000	DNA		+	+	
P22	41 724	DNA		+		+

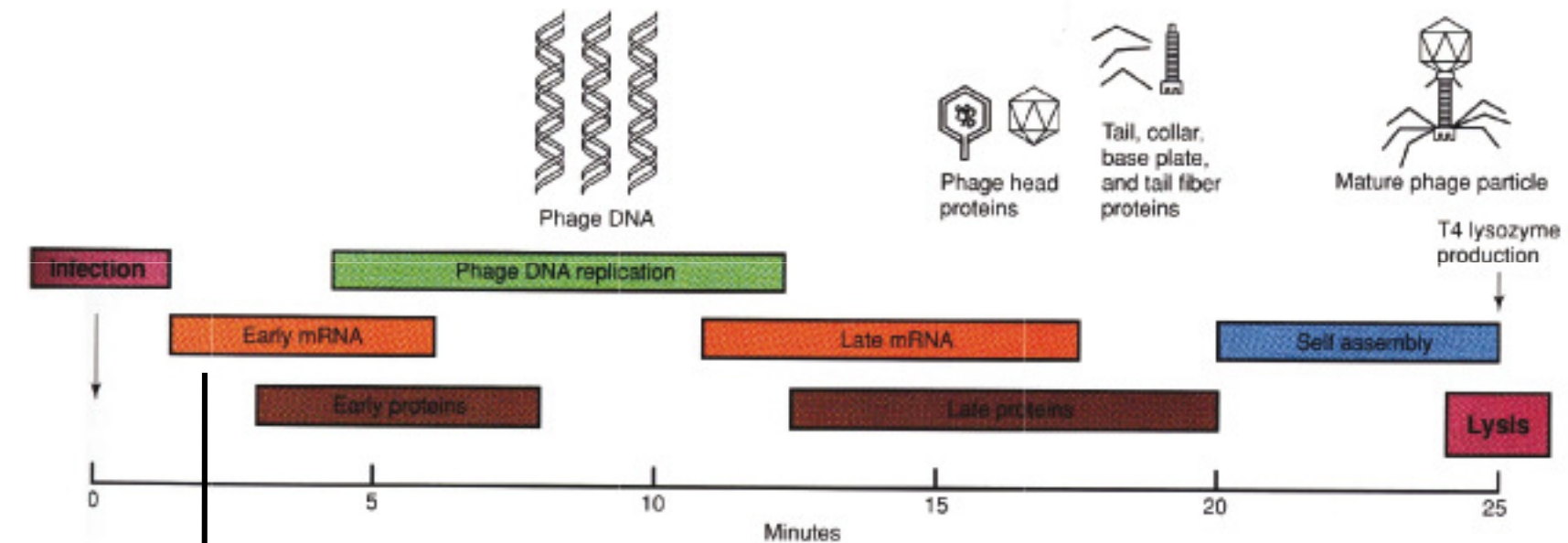
# Phagen EM

---



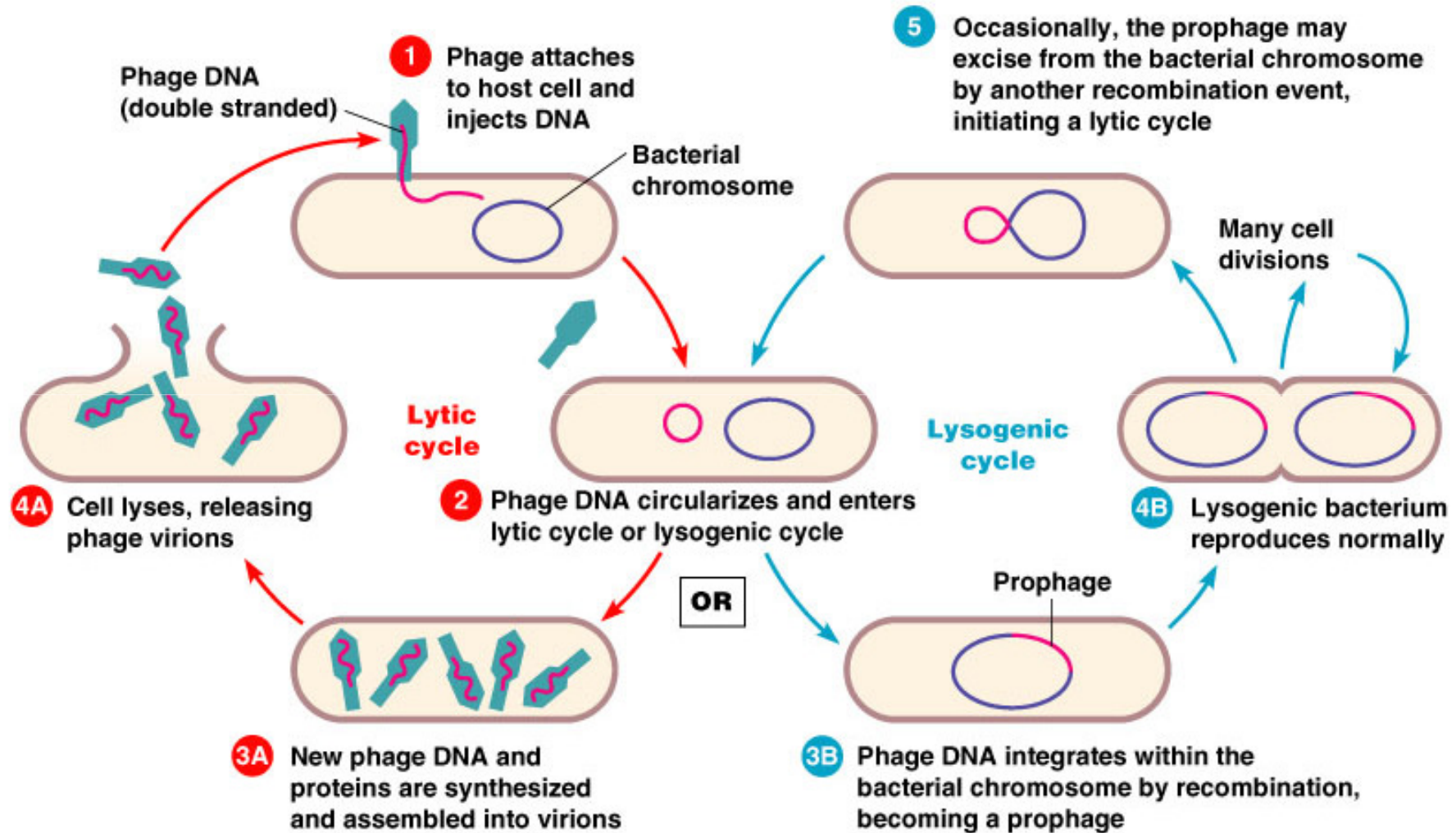


# Infektionszyklus T4



durch Wirts-Polymerase  
→ DNA Polymerasen  
→ Nucleasen  
→ Sigma-Faktoren

## $\lambda$ Phage/Prophage – lytic/lysogen



# Versuch I: Induktion von Prophagen

---

**Virulente** Phagen – sofort lytische Phase

**Temperente** Phagen – entweder lytisch oder lysogen → abh. von Repressoren



**$\lambda$**  →  $\lambda$  Repressorgen *cl* → Repressorprotein verhindert Transkription von Phagengenen, die für die lytische Funktion kodieren

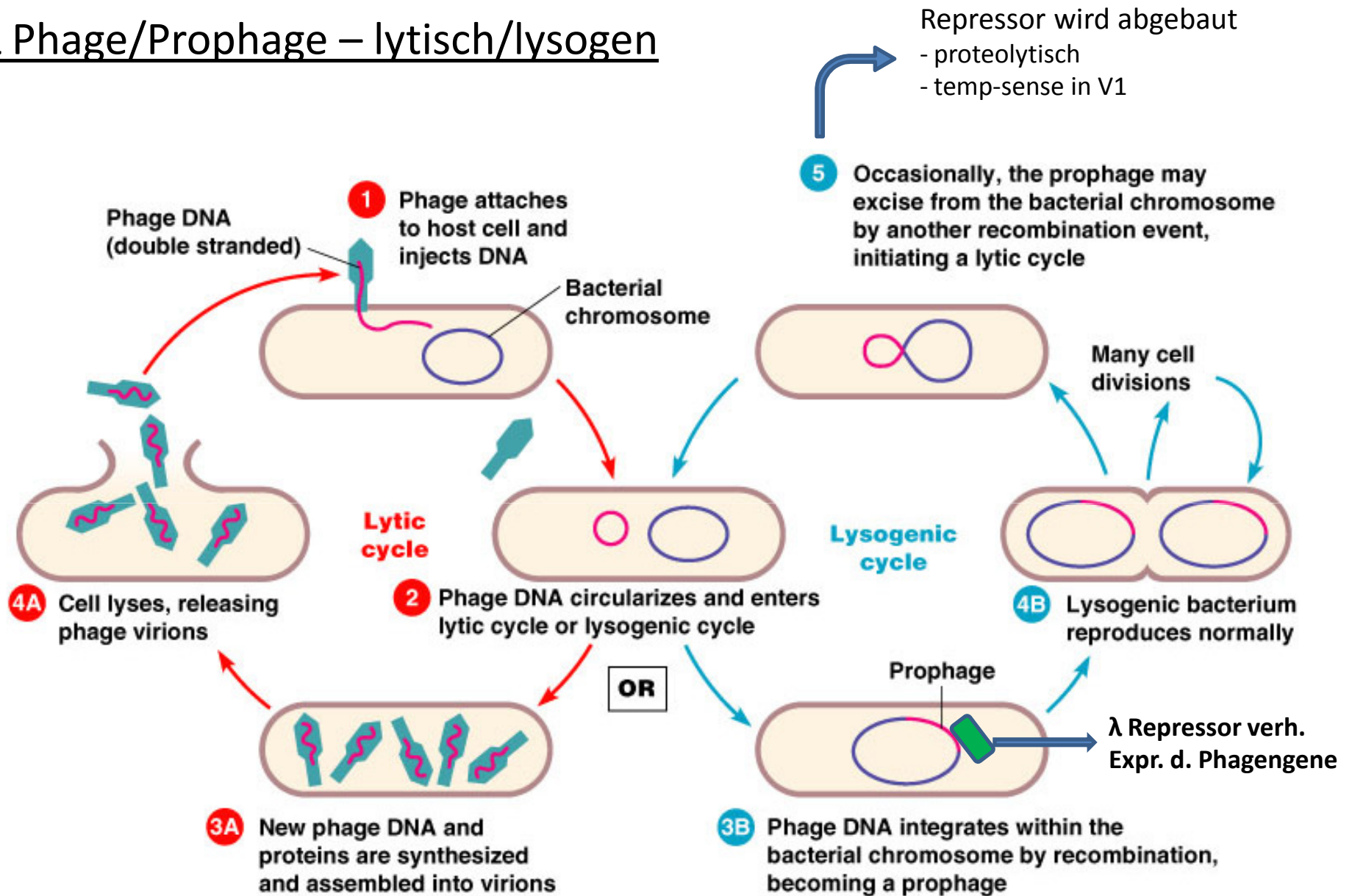


Zerstörung/Abbau/Fehlfunktion des  $\lambda$  Repressors hebt die Blockade der lytischen Gene auf



Excision der Phagen-DNA aus dem Wirtsgenom  
→ Phagenproduktion → Lyse

# λ Phage/Prophage – lytisch/lysogen



# Versuch I: Induktion von Prophagen

---

**Virulente** Phagen – sofort lytische Phase

**Temperente** Phagen – entweder lytisch oder lysogen → abh. von Repressoren



**$\lambda$**  →  $\lambda$  Repressorgen *cl*

→ Repressorprotein verhindert Transkription von Phagengenen, die für die lytische Funktion kodieren



Zerstörung/Abbau/Fehlfunktion des  $\lambda$  Repressors hebt die Blockade der lytischen Gene auf



Excision der Phagen-DNA aus dem Wirtsgenom  
→ Phagenproduktion → Lyse

$\lambda cl^{ts}$  : Repressor ist temperatursensitiv → bis 30°C Repressorfkt. normal  
→ 37-42°C Inakt. des Repressors

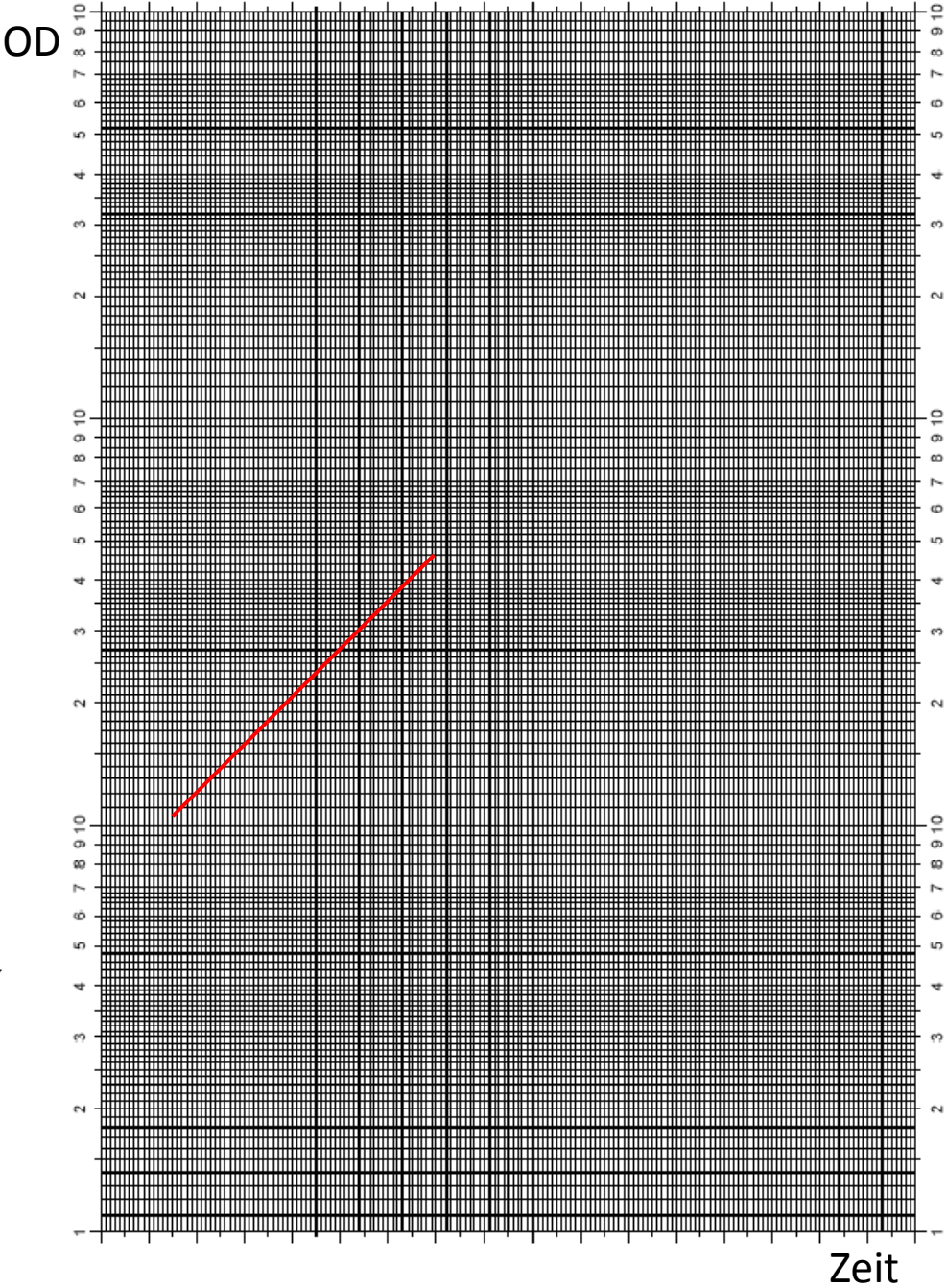
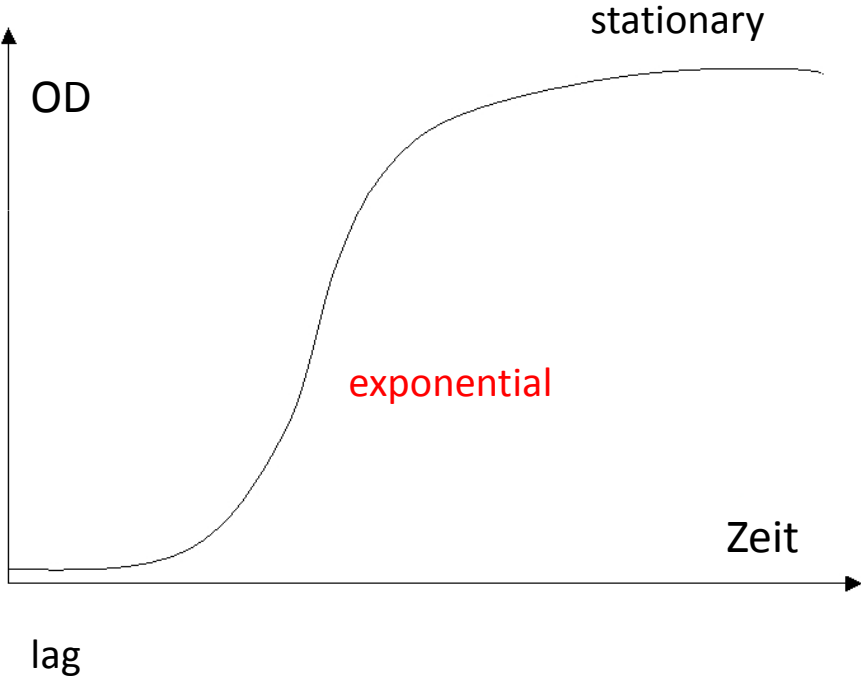


# Versuch I: Induktion von Prophagen

---

1. 20 ml Kultur von *E. coli* ( $\lambda$ cl<sup>ts</sup>) → Prophage schon drin!
2. Optische Dichte messen
3. 15 min Hitzeschock im 42°C Wasserbad → Inaktivierung des Repressors
4. Inkubation bei 37°C (Schüttler)
5. Alle 20 min OD messen und auf halblogarithmischem Papier dokumentieren
6. Parallel Saalkontrolle ohne Hitzeschock mit anschließender Inkubation bei RT

*E. coli* Wachstumskurve



### **Fragen fürs Protokoll:**

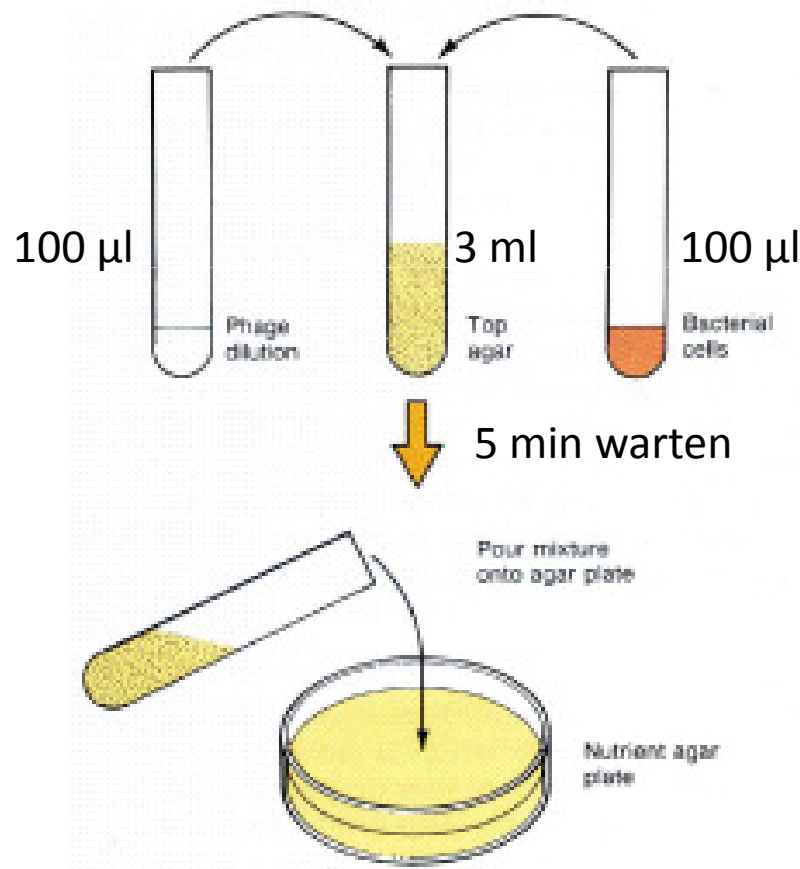
1. Warum sinkt die OD nicht auf Null?
2. Was wird passieren, wenn man die lysierten Kulturen bis morgen bei 37°C inkubieren würde? Begründen Sie Ihre Meinung.

# Versuch II: Phagentiterbestimmung

Wie hoch ist der Titer der Phagen in der lysierten *E. coli* Kultur?

→ Anzahl Phagen/ml

1. Verdünnungsreihe des Phagenlysats mit SM-Puffer bis  $10^{-7}$
2. Plattieren der letzten drei Verdünnungen ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ ) wie folgt:



3. Auszählen der Phagenplaques der letzten Praktikumsgruppe
4. Bestimmung des Titers

# Versuch II: Phagentiterbestimmung

---

## Berechnung des Titters in „plaque forming units per ml“ = pfu/ml

Beispiel:

$$10^{-5} = 120 \text{ plaques} \rightarrow 120 \cdot 10^5 \text{ pfu in } 100 \mu\text{l} = 120 \cdot 10^6 \text{ pfu/ml} = 1,2 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml}$$

$$10^{-6} = 14 \text{ plaques} \rightarrow 14 \cdot 10^6 \text{ plaques in } 100 \mu\text{l} = 14 \cdot 10^7 \text{ pfu/ml} = 1,4 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml}$$

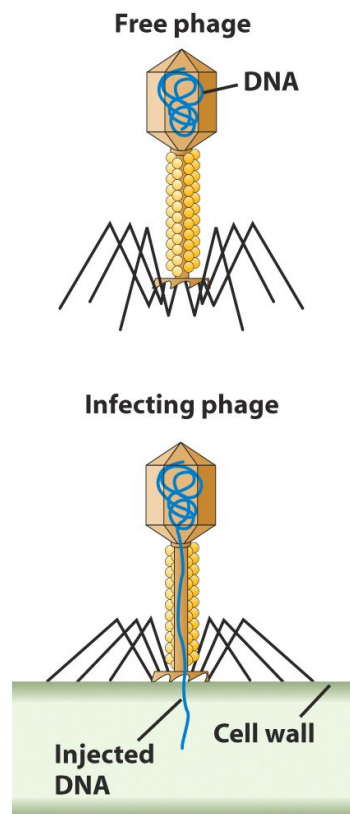
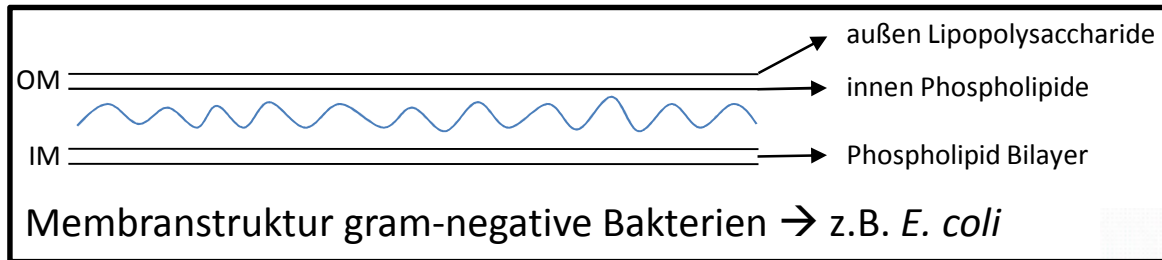
$$10^{-7} = 2 \text{ plaques} \rightarrow 2 \cdot 10^7 \text{ plaques in } 100 \mu\text{l} = 2 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml} = 2 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml}$$

Mittelwertberechnung:

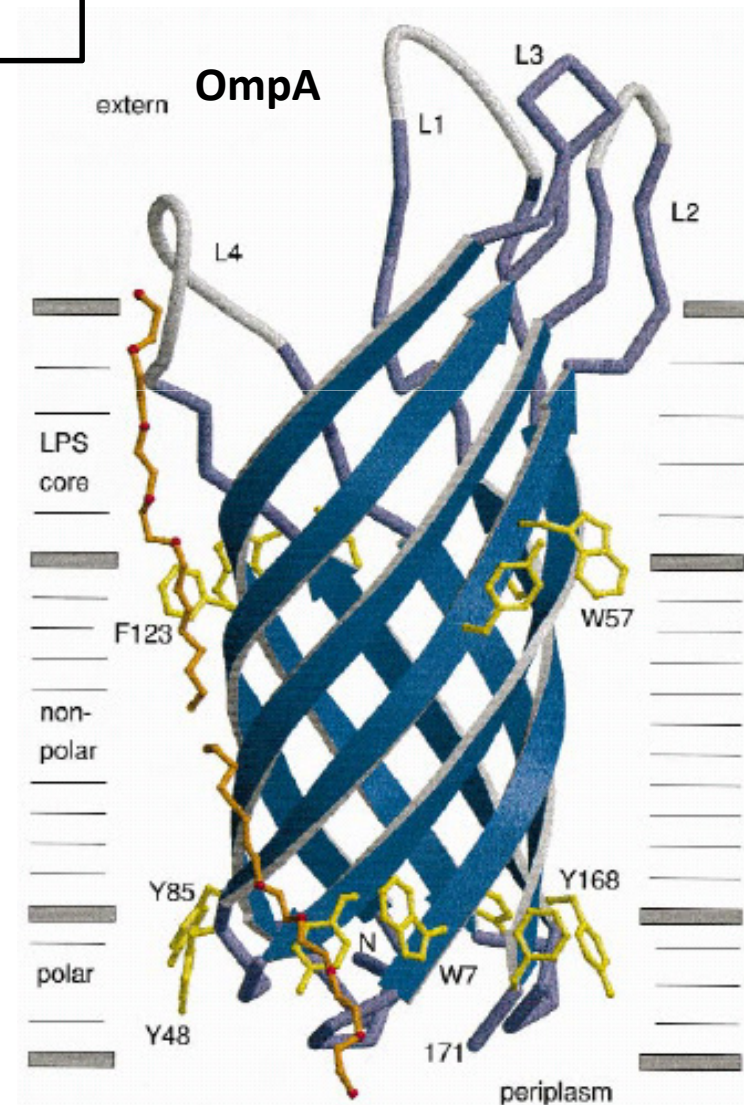
$$\left. \begin{array}{l} 1,2 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml} \\ 1,4 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml} \end{array} \right\} \bar{x} = 1,3 \cdot 10^8 \text{ pfu/ml}$$



# OMPs - Außenmembranproteine



Gibt es spezifische Binde-/Erkennungsstellen an der äußeren Membran der Bakterien für Phagen?



# Funktion OMPs

Protein	Größe	Funktion	Phagen
Lpp	58	strukturelle Funktion	
OmpA	325	strukturelle Funktion	TuII*, K3, M1, Ox2
OmpX	148	Pathogenität	
PldA	269	Phospholipase	
OmpT	297	Protease	M1h1.1h1
OmpP	292	Protease	Ox2h12h1.1
OmpC	346	Diffusionspore	TuIb, T4, SS1, TP2, PA2, M1h1.1
OmpF	340	Diffusionspore	TuIa, TP1, TP2, SQ108
OmpN	356	Diffusionspore	
PhoE	330	Anionen-spezifische Diffusionspore	TC23, TC45
LamB	421	Maltodextrin-spezifische Pore	$\lambda$ , K10, TP1, SS1
FadL	421	Fettsäuretransport	T2
Tsx	262	Nukleosid-spezifische Pore	T6, Ox1, K9, H8
BtuB	594	Vitamin B <sub>12</sub> -Rezeptor	BF23
CirA	638	?	
FecA	741	Eisendicitrat-Rezeptor	
FepA	724	Enterobactin-Rezeptor	
FhuA	714	Ferrichrom-Rezeptor	T1, T5, $\phi$ 80, UC-1
FhuE	693	Coprogen-Rezeptor	
IutA	707	Aerobactin-Rezeptor	
TolC	471	Typ I-Proteinsekretion, Export niedermolekularer Substanzen	

**Phagenresistenz:** Omp wird deletiert oder so mutiert, dass der Phage nicht mehr binden kann.

## Genotypen und Phänotypen der *E. coli*-Stämme:

Phage:	Lambda	K3	Tu1b	Tu1a
Rezeptorprotein:	LamB	OmpA	OmpC	OmpF
Bakterienstamm				
K12 (Wildtyp)				
B (Wildtyp)			OmpC <sup>-</sup>	
OMP1	$\Delta lamB$		OmpC <sup>-</sup>	
OMP2			OmpC <sup>-</sup>	<i>ompF::Tn5</i>
OMP3	$\Delta lamB$		OmpC <sup>-</sup>	<i>ompF::Tn5</i>
OMP4	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	OmpC <sup>-</sup>	<i>ompF::Tn5</i>
OMP6	$\Delta lamB$		$\Delta ompC$	
OMP7	$\Delta lamB$		$\Delta ompC$	<i>ompF::Tn5</i>
OMP8	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	$\Delta ompC$	<i>ompF::Tn5</i>
OMP12	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$	$\Delta ompC$	
UH300		$\Delta ompA$		
UH310	$\Delta lamB$	$\Delta ompA$		

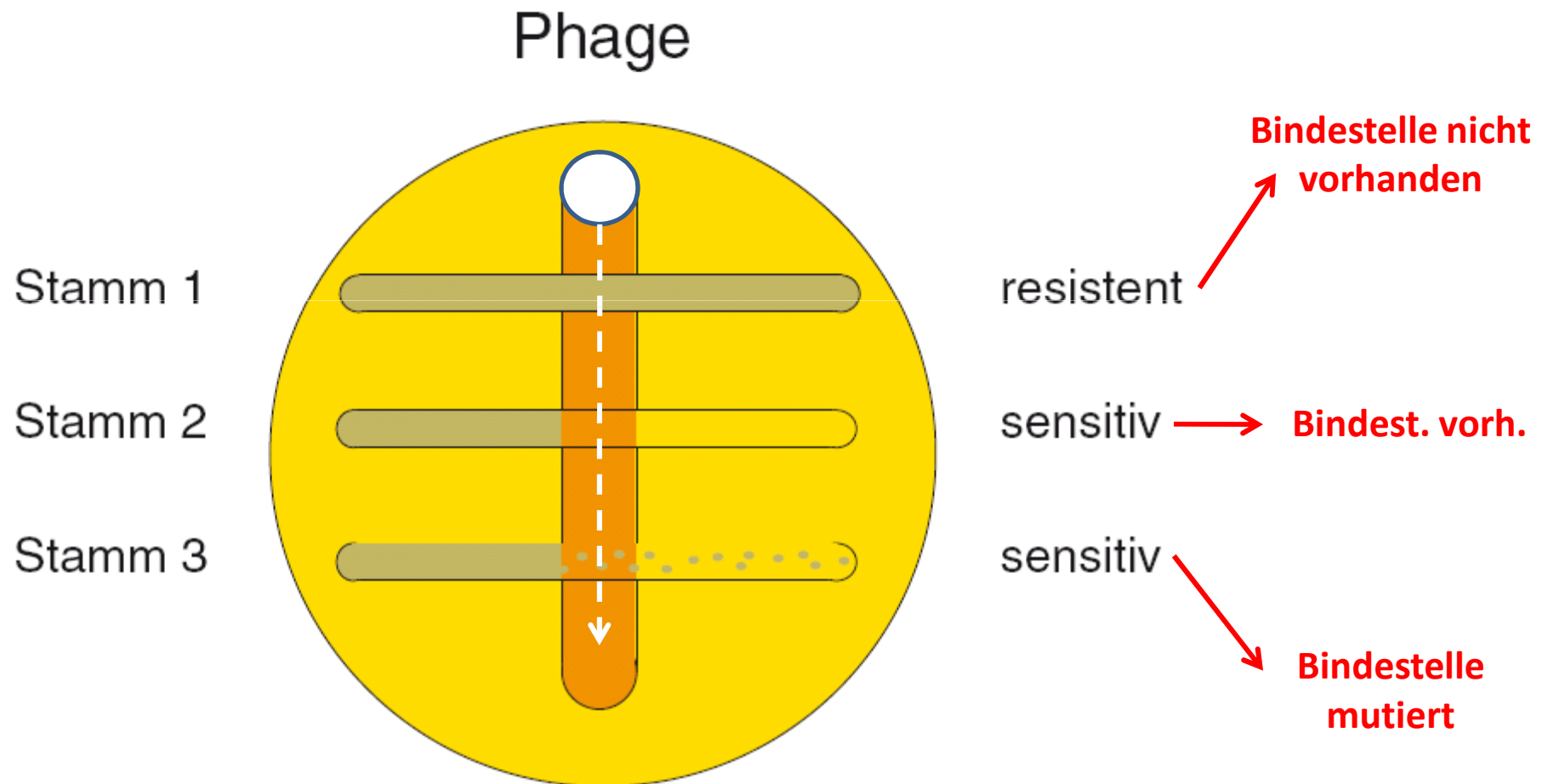
$\Delta$  = Deletion des Gens  $\rightarrow$  z.B.  $\Delta lamB$

<sup>-</sup> = Gen ok, aber Regulator nicht funktionell  $\rightarrow$  kein Protein  $\rightarrow$  z.B. OmpC<sup>-</sup>

Tn = Transposoninsertion

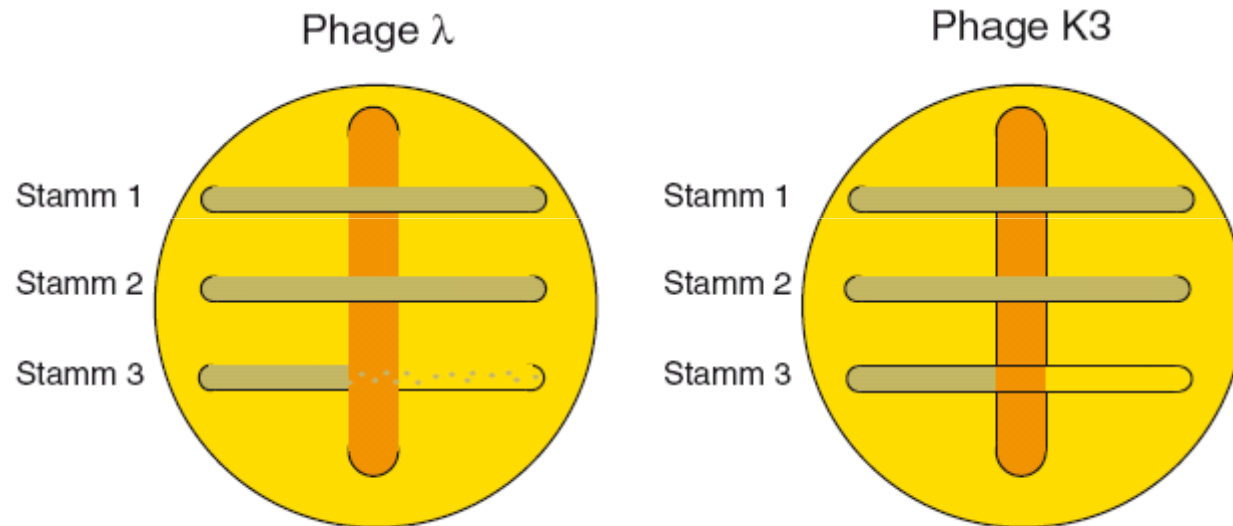
# Versuch III: Querstrichtest

Diverse Bakterienstämme (*E. coli*) weisen variable Resistenzen gegenüber verschiedenen Phagen auf:



# Versuch III: Querstrichtest

---

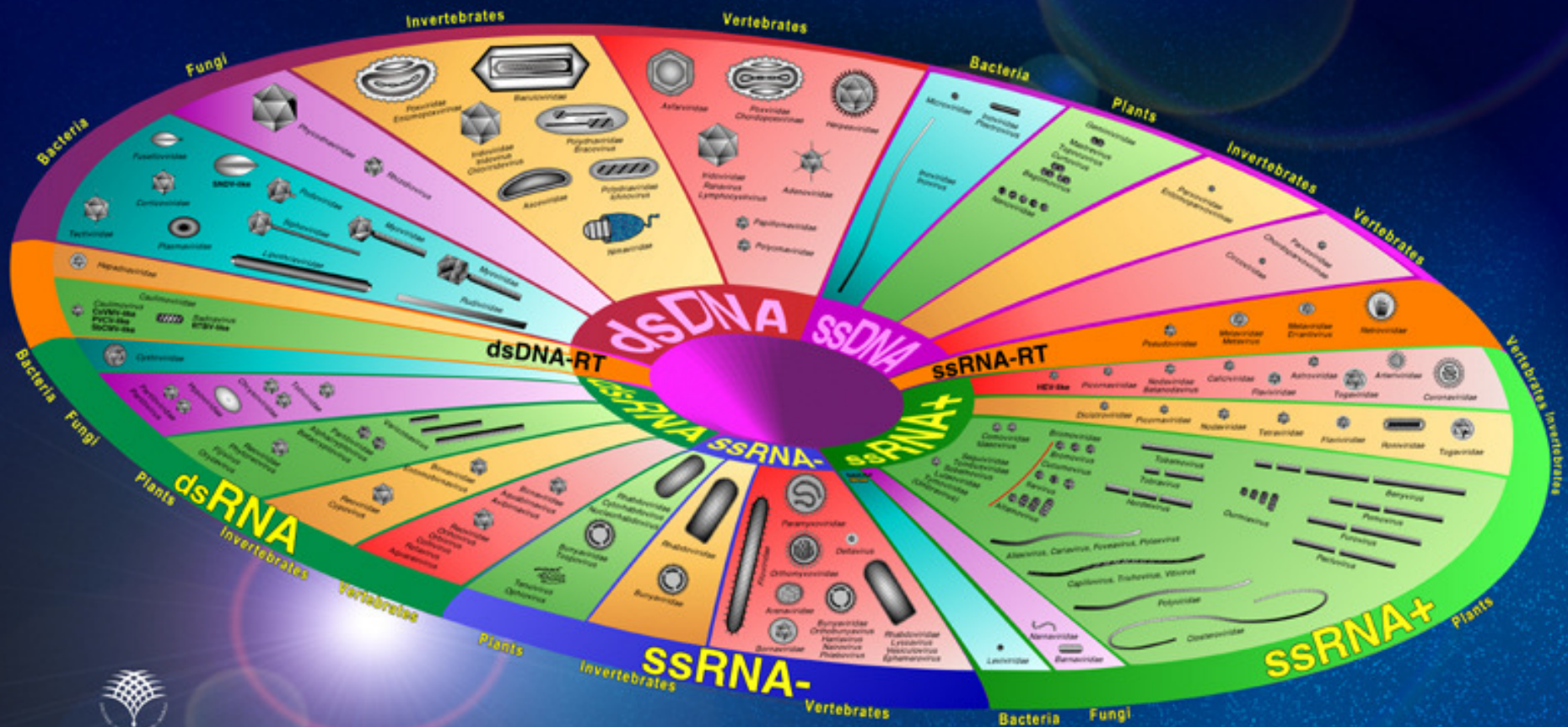






# Viren und Wirte

## Virosphere 2002



DONALD DANFORTH  
PLANT SCIENCE CENTER

copyright©2002 C.M.Fauquet

International Committee on Taxonomy of Viruses

